

自然発症糖尿病GK（後藤-柿崎）ラット肝における インスリン抵抗性と肝糖代謝酵素から見た抵抗性の 検討

著者	阿部 茂樹
号	1047
発行年	1990
URL	http://hdl.handle.net/10097/20333

論文内容要旨

目 的

GK（後藤—柿崎）ラットは、Wistarラットから経口糖負荷試験の血糖和を指標に選択的継代交配を行なうことによって作製された自然発症糖尿病ラットであり、インスリン非依存性糖尿病モデル動物とされている。インスリン作用の検討でグルコースクランプ実験の結果、GKラットでは筋肉及び脂肪組織の糖利用は対照と差異は無いが肝糖産生はインスリン注入によって抑制されないことが示された。GKラットにおけるインスリン抵抗性は主に肝臓に存在することが示されたことから、本研究ではGKラット肝についてその病態を解明すべく以下の検討を加えた。

方 法

1) 初代培養肝細胞におけるグリコーゲン合成、脂肪合成、DNA合成をそれぞれU- ^{14}C glucose, ^{14}C -acetate, ^3H -methyl thymidineの取り込みによって、netの値を測定した。2) インスリンレセプターのbinding assay初代培養肝細胞に、 $0-10^{-6}\text{M}$ の濃度列インスリンと [^{125}I -A14] human insulinを同時に添加し測定した。3) 12週齢ラットを対象として肝糖代謝系律速酵（Glycogen代謝系、解糖系、糖新生系酵素）を自由摂食下と24時間絶食下の両条件で測定した。蛋白測定はBio-rad protein assay kitを用いた。酵素活性はnanomole/mg protein/minで示した。

結 果

I・初代培養肝細胞を用いた実験

1) DNA合成におけるdose-responseを検討するとhalf maximal responseを示すインスリン濃度（以下ED 50と略する）は正常対照の 10^{-9}M に対してGKラットでは $3 \times 10^{-9}\text{M}$ であり、dose-response curveの右方移動を認めることによりインスリン感受性の低下が示され、同時に正常対照に比較して最大反応の低下もGKラットで認められた。lipid synthesisのED 50は正常対照とGKラットでおなじく 10^{-9}M であったが、最大反応は正常対照に比較してGKラットで低下していた。glycogen synthesisのED 50は正常対照とGKラットでおなじく $3 \times 10^{-9}\text{M}$ であったが、最大反応は正常対照の半分以下であり著明な反応性低下が見られた。2) インスリンレセプターのbinding assayでは正常対照とGKラットの間に差異は見られなかった。Scatchard plotの分析でもレセプター数、親和性とも差異を認めなかった。

II・ラット生体肝を用いた実験

3) 自由摂食条件下でグリコーゲン代謝酵素では、glycogen synthetase活性が正常対照の

4.44±0.59に対してGKラットでは5.38±0.69, 解糖系酵素ではglucokinase活性が, 正常対照の13.3±0.9に対してGKラットの22.1±1.4, 糖新生系でglucose-6-phosphatase活性が, 正常対照の59.1±1.8に対してGKラットの76.5±1.4であった。これらの結果例が示すように肝糖代謝律速酵素活性は解糖系, 糖新生系, グリコーゲン代謝系酵素の全ての系においてGKラットで有意に昂進していた。この傾向は自由摂食と24時間絶食の双方の条件下において認められた。GKラットで糖新生系酵素が, 解糖系酵素に比べ, 特に相対的に昂進しているという傾向は見られなかった。

考 察

親和性とレセプター数に差異を認めず, 脂質, グリコーゲン, DNA合成のインスリン反応性の低下を認めたことからGKラットにはpost receptor binding defectの存在することが示された。thymidineの取込では dose response curveにて感受性と反応性の双方が低下していたのに対し, 脂肪合成では反応性の低下のみが認められ, またglycogen合成による検討では, 前2者に比較して著明な反応性の低下が認められた。これらの事実はGKラットではインスリンがレセプターに結合した後の段階での多様な作用点が障害 (multipoint defects) を受け得ることを示すものと考えられる。とくにglycogen合成の著明な反応性の低下はGKラットでは肝のブドウ糖の利用がmethyl thymidineやacetateに比較して選択的に障害されていることを示唆している。また, STZにて制作されたⅡ型糖尿病モデルラットにおける初代培養肝細胞を用い, 脂肪合成を指標としてインスリン感受性を検討した実験では正常対照に比較して感受性の昂進が見られたと報告されている。インスリン不足に起因した感受性の昂進と考えられるが, 同じⅡ型糖尿病モデルとされるGKラットではこの現象は見られなかった。この差異は膵臓起源のみの糖尿病である前者に対して, 後者では継代交配によるインスリン抵抗性の素因の蓄積が同時に関与していることを示すものと考えられる。GKラット肝のインスリン抵抗性を糖代謝動態から検討するために行った糖代謝律速酵素活性測定ではグリコーゲン合成, 分解あるいは解糖系, 糖新生系の両系の活性同時昂進という特徴が見られた。このことから肝臓内における物質代謝のturn overの昂進やFutile cyclesの存在が想定された。

審 査 結 果 の 要 旨

耐糖能を指標として選択的交配を行うことにより作製された自然発症糖尿病モデル動物GK（後藤一柿崎）ラットは組織学のおよび内分泌学的検討からインスリン非依存性糖尿病（NIDDM）のよりモデル動物と考えられている。杉山（参考論文）らのeuglycemic clamp法を用いたin vivoインスリン感受性の検討から、GKラットではヒトNIDDM症例の場合と同様インスリン抵抗性が認められ、その主要部位が肝臓であることが明らかとなっている。

本研究はGKラットより初代培養肝細胞を調製し、これを用いて肝のインスリン抵抗性の分子機序を検討したものである。肝細胞におけるインスリン抵抗性について、インスリンレセプター、DNA合成、脂肪合成とグリコーゲン合成を指標としてDose response curveを検討して、インスリン感受性の低下、インスリン反応性の低下、あるいは両者の合併の3型に分類した。GKラット肝細胞では対照正常Wisterラット肝細胞に比較して、DNA合成におけるインスリン感受性・反応性の低下、脂肪合成とグリコーゲン合成におけるインスリン反応性の低下が明らかとなった。GKラット肝細胞のインスリンレセプターのScatch and plot分析では対照と比べてレセプター数、親和性とも差異は認めなかった。これらの事実は、GKラットではインスリンがレセプターに結合した後の多様な作用点が障害（post-binding multipoint defects）をうけていることを示すものと考えられる。またこの成績はヒトNIDDM症例での報告とも一致し、GKラットがインスリン抵抗性の面でもNIDDMのモデルとなりうることを示している。

本研究では肝臓の糖代謝律速酵素も測定しGKラット肝では糖新生系酵素のみならず、解糖系酵素とGlycogen synthaseの活性亢進も同時に存在することが明らかとなった。この成績もヒトNIDDM症例の報告と一致している。GKラット門脈血中インスリンの正常へ軽度低値と高血糖がGlucokinaseとGlycogen synthase活性亢進を誘導したものと想定された。

以上のように、本研究はGKラットの肝に認めるインスリン抵抗性の分子機序を検討して、ヒトNIDDM症例の場合と同様に、インスリンがレセプターと結合した後の段階での多様な作用点が障害されている（Post-binding multipoint defects）ことを明らかにした。GKラットがインスリン抵抗性の面でもNIDDMのモデルとなることを示し、成因研究のため有力なモデルであることを明らかにした。本研究は以上の意味で新知見の多い、かつ独創的な研究であり、充分学位に値するものと考えられる。